

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**ANIELE CAROLINA RIBAS LEÃO**

**MONTAGEM DO GENOMA DE *Fonsecaea multimorphosa*  
CBS 980.96<sup>T</sup> FUNGO ISOLADO DE ABSCESSO CEREBRAL FELINO**

**CURITIBA**

**2016**

ANIELE CAROLINA RIBAS LEÃO

**MONTAGEM DO GENOMA DE *Fonsecaea multimorphosa* CBS 980.96<sup>T</sup>  
FUNGO ISOLADO DE ABSCESSO CEREBRAL FELINO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioinformática, Setor de Educação Profissional e Tecnológica, Universidade Federal do Paraná, área de concentração Bioinformática, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Bioinformática.

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Maltempo de Souza

Co-orientador: Dr. Vinícius Almir Weiss

CURITIBA

L437

Leão, Aniele Carolina Ribas.

Montagem do genoma de *Fonsecaea multimorphosa* CBS 980.96<sup>t</sup>  
fungo isolado de abscesso cerebral felino / Aniele Carolina Ribas Leão  
- Curitiba, 2016.

49 f.: il., tabs, grafs.

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza

Coorientador: Dr. Vinícius Almir Weiss

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor  
de Educação Profissional e Tecnológica, Curso de Pós-Graduação em  
Bioinformática.

1. Leveduras (fungos). 2. Genômica. 3. *Fonsecaea*.  
4. Bioinformática. I. Souza, Emanuel Maltempi de. II. Weiss, Vinícius  
Almir. III. Título. IV. Universidade Federal do Paraná.

CDD 575.113

## TERMO DE APROVAÇÃO

**ANIELE CAROLINA RIBAS LEÃO**

### **"MONTAGEM DO GENOMA DE *Fonsecaea multimorphosa* CBS 980.96 - FUNGO ISOLADO DE ABSCESSO CEREBRAL FELINO"**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioinformática, pelo Programa de Pós-graduação em Bioinformática, Setor de Educação Profissional e Tecnológica, da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Dr. Emanuel Maltempi de Souza  
Universidade Federal do Paraná - UFPR



Dr. Roberto Tadeu Raittz  
Universidade Federal do Paraná - UFPR



Drª. Vânia Aparecida Vicente  
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Curitiba, 28 de abril de 2016

Dedico este trabalho aos meus avós, meus pais,  
minha irmã e ao meu amor.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, por sempre guiar meus passos.

Ao meu orientador, Professor Dr. Emanuel Maltempi, muito obrigada pela oportunidade, por aceitar me orientar e principalmente pela sugestão de tema para trabalho.

Dr. Vinicius Weiss, sem a sua orientação eu não conseguiria chegar até aqui. Obrigada por todos os ensinamentos, paciência e dedicação ao longo desses 2 anos.

Professora Dra. Vânia A. Vicente, obrigada por me permitir fazer parte da sua equipe e pesquisa, pesquisa a qual me apaixonei.

Professores Dra. Maria Berenice Steffens e Dr. Roberto Raittz, obrigada pelas conversas, ensinamentos e pelo incentivo constante.

Dra. Izabella Weiss, obrigada pela paciência quando eu resolvia conversar com o Vinicius na hora de ir embora e pelas correções do trabalho.

À equipe dos laboratórios de Microbiologia, Bioquímica e Biologia molecular pelo preparo, cultivo e sequenciamento do fungo usado no trabalho, muito obrigada.

Ao INCT - Fixação Biológica de Nitrogênio, pela espaço cedido para o sequenciamento do fungo.

Aos meus avós que sempre acreditaram em mim e me incentivaram, muito obrigada! Amo vocês!

Aos meus pais e minha irmã Amanda, muito obrigada por todo apoio, incentivo e dedicação. Vocês fazem parte dessa conquista. Amo vocês!

Rodrigo Langowski, meu amor! Obrigada por iluminar meus dias, mesmo quando estão cinzentos, mas principalmente por insistir e não desistir. Amo você!

Sheyla Trefflich, muito obrigada por tudo! Sem sua amizade, seus conselhos e ombro amigo nesses 2 anos, tudo teria sido mais difícil!

Mestres Flávia Costa e Amanda Bombassaro, obrigada pelas risadas, conversas e por compartilharem dos momentos de dificuldades do trabalho.

Aos amigos do laboratório, Marthin, Nilson, Vinicius Chagas e Calebe, obrigada por todas as conversas e risadas.

A equipe Reginal Student Group Brazil e International Society for Computational Biology pela confiança e oportunidade de liderar o grupo no Brasil.

Aos meus amigos, que entenderam minha ausência em diversos momentos.

Ao Programa de Pós Graduação em Bioinformática e em especial à Suzana Gobetti, obrigada pelas palavras de incentivo e atenção.

As minhas professoras de graduação Profa. Jannaina Vasco, Dra. Lilian Ferrari, Dra. Liya Mikami, Dra. Camila Marques, Dra. Emanuele Pesenti e Profa. Lisangela Oliveira, que me motivaram a chegar até aqui, muito obrigada!

A CAPES, agradeço por financiar estes dois anos de mestrado.

“Nós não somos o que gostaríamos de ser.

Nós não somos o que ainda iremos ser.

Mas, graças a Deus,

Não somos mais quem nós éramos.”

“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo.”

Martin Luther King



## RESUMO

*Fonsecaea multimorphosa* é uma levedura negra da ordem *Chaetothyriales* encontrado no meio ambiente e em animais. *F. multimorphosa* CBS 980.96<sup>T</sup>, em contraste com outras linhagem ambientais do Brasil, foi isolado de um abscesso cerebral felino na Austrália. Infecções cerebrais causadas por fungos filamentosos, causadas por *F. multimorphosa* são raras em animais, por esta razão destaca-se a importância de ter seu genoma sequenciado e estudado. O sequenciamento do genoma de *F. multimorphosa* CBS 980.96<sup>T</sup> foi realizado na plataforma Illumina MiSeq gerando ~7 milhões de pares de base. O montador SPAdes foi utilizado para a montagem do genoma e o *software* FGAP utilizado para o fechamento dos *gaps*. O *draft* do genoma resultou em 163 *contigs* que compreendem ~34Mbp e 52% de conteúdo GC. A anotação do genoma foi realizada utilizando o identificador de ORF GeneMark que identificou 11.772 genes e os *softwares* RAFTS3 e InterProScan foram utilizados para pesquisa de sequências de similaridade. A sequência do DNA mitocondrial foi montada resultando em uma molécula circular de 27KB. O genoma mitocondrial é muito semelhante ao DNA mitocondrial das leveduras negras *Fonsecaea pedrosoi* CBS 271.37 e *Exophiala dermatitidis* NIH:UT8656.

Palavras-chave: *Fonsecaea*. Leveduras negras. Genômica. Bioinformática.

## ABSTRACT

*Fonsecaea multimorphosa* is a black yeast of the *Chaetothyriales* order found in the environment and animal hosts. *F. multimorphosa* CBS 980.96<sup>T</sup>, in contrast with other environmental strains from Brazil, was isolated from a cat brain abscess in Australia. Brain infections caused by filamentous fungi such the infection caused by *F. multimorphosa* are rare in animals. The unique characteristic of this strain justifies the sequencing of this genome. The genome sequencing of *F. multimorphosa* CBS 980.96<sup>T</sup> was performed in the Illumina MiSeq platform generating ~7 million of paired-end reads. The SPAdes assembler was used for the genome assembly and the FGAP software as a gap closure tool. The draft assembly was obtained resulting in 163 contigs that comprise ~34Mbp and 52% GC content. The genome annotation was performed using the gene finder software GeneMark which identified 11.772 genes. RAFTS3 and InterProScan softwares were used for sequence similarity searches. The sequence of the mitochondrial DNA was also assembled producing a circular molecule of 27Kb. The mitochondrial genome is highly similar to the *Fonsecaea pedrosoi* CBS 271.37 and *Exophiala dermatitidis* NIH:UT8656. mtDNA.

Key words: *Fonsecaea*. Black yeast. Genomic. Bioinformatics.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 – LOBO OCCIPITAL ESQUERDO DO CÉREBRO DO GATO INFECTADO POR <i>F. multimorphosa</i> CBS 980.96 <sup>T</sup> .....	19
FIGURA 02 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DE APRESENTAÇÃO DA NOVA ESPÉCIE DO FUNGO <i>Fonsecaea multimorphosa</i> CBS 980.96 <sup>T</sup> . .....	21
FIGURA 03 – MONTAGEM <i>DE NOVO</i> DE GENOMA. ....	24
FIGURA 04 – FLUXOGRAMA DO TRABALHO REALIZADO DURANTE A MONTAGEM DO GENOMA TOTAL DO FUNGO <i>F. multimorphosa</i> CBS 980.96 <sup>T</sup> ...	28
FIGURA 05 – FLUXOGRAMA DA MONTAGEM DO GENOMA MITOCONDRIAL DO FUNGO <i>Fonsecaea multimorphosa</i> CBS 980.96 <sup>T</sup> . ....	30
FIGURA 06 – GENOMA DE <i>F. multimorphosa</i> CBS 980.96 <sup>T</sup> ALINHADO COM O GENOMA DO FUNGO <i>F. multimorphosa</i> CBS 102226. ....	33
FIGURA 07 – COMPARAÇÃO FILOGENÉTICA DO GENE <i>CDC42</i> ENTRE ALGUMAS ESPÉCIES DE <i>FONSECAEA</i> . ....	36
FIGURA 08 – COMPARAÇÃO FILOGENÉTICA DO GENE <i>ITS</i> ENTRE ALGUMAS ESPÉCIES DE <i>FONSECAEA</i> . ....	37
FIGURA 09 – GENOMA MITOCONDRIAL CIRCULARIZADO. ....	39
FIGURA 10 – GENOMA MITOCONDRIAL DE <i>F. multimorphosa</i> CBS 980.96 <sup>T</sup> ALINHADO COM O GENOMA DO FUNGO <i>F. pedrosoi</i> CBS 271.37. ....	40

## LISTA DE TABELAS

TABELA 01 –ESPÉCIES DO GÊNERO <i>FONSECAEA</i> E FONTE DE ISOLAMENTO. .....	18
TABELA 02 – FERRAMENTAS UTILIZADAS PARA A MONTAGEM DO GENOMA DA <i>Fonsecaea multimorphosa</i> CBS 980.96 <sup>T</sup> . ....	25
TABELA 03 – RESULTADO DOS SEQUENCIAMENTOS REALIZADOS NO SEQUENCIADOR ILLUMINA – MISEQ. ....	31
TABELA 04 – RESULTADO OBTIDOS COM OS MONTADORES USADOS.....	32
TABELA 05 – LOCALIZAÇÃO DOS tRNAs NO GENOMA DE <i>F. multimorphosa</i> CBS 980.96 <sup>T</sup> . ....	35
TABELA 06 – RESUMO FINAL DA MONTAGEM DO GENOMA DO FUNGO <i>F.</i> <i>multimorphosa</i> CBS 980.96 <sup>T</sup> . ....	38
TABELA 07 – RESULTADOS OBTIDOS NA MONTAGEM DO DNA MITOCONDRIAL DO FUNGO <i>Fonsecaea multimorphosa</i> CBS 980.96 <sup>T</sup> . ....	38
TABELA 08 – RELAÇÃO DA QUANTIDADE DE PROTEÍNAS ANOTADAS NO GENOMA MITOCONDRIAL DO FUNGO <i>F. multimorphosa</i> CBS 980.96 <sup>T</sup> . ....	40
TABELA 09 – RELAÇÃO AMINOÁCIDOS DOS tRNAs DO GENOMA MITOCONDRIAL DO FUNGOS <i>F. multimorphosa</i> CBS 980.96 <sup>T</sup> . ....	41

## LISTA DE SIGLAS

*BET2* – Beta tubulina 2

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

BLAT – BLAST Like Aligment Tool

CBS – Fungal Biodiversity Centre

*CDC42* – Controle de Divisão Celular 42

CDS – Sequência Codificadora de Proteínas

DNA – Ácido desoxirribonucleico

FGAP – Fecha Gap

GO – Gene Ontology

*HSP72* – Proteína de choque térmico 72

*HSP90* – Proteína de choque térmico 90

*HSP98* – Proteína de choque térmico 98

*ITS* – Região de transcrição interna

MATLAB – Laboratório Matrix

NCBI – National Center for Biotechnology Information

ORF – Fase de leitura entre o códon de início e o de fim

RAFTS3 – Rapid Alignment Free Tool for Sequence Similarity Search

RNA – Ácido ribonucleico

SILA – Genome Automated Annotation System

UFPR – Universidade Federal do Paraná

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ala – Alanina  
Arg – Arginina  
Asn – Asparagina  
Cys – Cisteína  
ed – edição  
Gln – Glutamina  
Glu – Glutamato  
Gly – Glicina  
His – Histidina  
Ile – Isoleucina  
Kbp – Kilo pares de base  
Leu – Leucina  
Lys – Lisina  
Mb – Mega pares de base  
Met – Metionina  
mtDNA – DNA mitocondrial  
pb – pares de base  
Phe – Fenilalanina  
Pro – Prolina  
Ser – Serina  
tRNA – RNA transportador  
Tyr – Tirosina  
Val – Valina

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>16</b>
2.1	OBJETIVO GERAL	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>17</b>
3.1.	GÊNERO <i>Fonsecaea</i>	17
3.2.	<i>Fonsecaea multimorphosa</i> CBS 980.86 <sup>T</sup>	19
3.3.	SEQUENCIAMENTO GENÔMICO	20
3.4.	MONTAGEM DE GENOMA	22
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>25</b>
4.1.	SERVIDOR	25
4.2.	FERRAMENTAS UTILIZADAS	25
4.3.	MONTAGEM E ORDENAÇÃO	26
4.4.	MAPEAMENTO	26
4.5.	FECHAMENTO DE GAP	26
4.6.	ANOTAÇÃO	27
4.7.	FLUXOGRAMA DO TRABALHO	27
4.8.	MONTAGEM DO GENOMA MITOCONDRIAL	29
4.9.	FLUXOGRAMA DA MONTAGEM DO GENOMA MITOCONDRIAL	29
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>31</b>
5.1.	DADOS BRUTOS	31
5.2.	MONTAGEM DO GENOMA TOTAL	31
5.3.	FECHAMENTO DE GAP	32
5.4.	DOTPLOT	32
5.5.	ANOTAÇÃO	33
5.6.	COMPARAÇÃO FILOGENÉTICA	35
5.7.	GENOMA FINAL	37
5.8.	GENOMA MITOCONDRIAL	38
5.9.	DOTPLOT	39
5.10.	ANOTAÇÃO	40

<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>42</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>43</b>



## 1 INTRODUÇÃO

Organismos eucarióticos, como os fungos, começaram a ter seus genomas sequenciados e estudados a partir de 1996, com o sequenciamento do genoma da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Goffeau *et al* 1996). Após este primeiro sequenciamento, o número de estudos de genomas complexos vem crescendo a cada ano.

Com a evolução das técnicas de sequenciamento e desenvolvimento de *softwares* de bioinformática, etapas como montagem e análise de genomas vem sendo facilitadas, o que torna o processo mais rápido e traz melhoria na qualidade e quantidade dos dados (Dalmolin 2012).

Estudos genômicos trazem benefícios tanto para a área da saúde e pesquisa como para a agricultura, favorecendo a economia e proporcionando melhoria nas condições de saúde (Am 2015; Holte *et al* 2015; Carrer, Barbosa e Ramiro 2010). A partir do conhecimento sobre a presença de determinado gene em um organismo, é possível realizar estudos para o desenvolvimento de medicamentos, oferecendo melhor qualidade de vida.

O sequenciamento e análise do genoma de diferentes espécies da família *Herpotrichiellaceae*, por exemplo, permitirá a compreensão dos mecanismos de infecção e patogenicidade em hospedeiros humanos e animais, como o caso da linhagem CBS 980.96<sup>T</sup> da espécie *Fonsecaea multimorphosa*. Esta espécie só havia sido encontrada no meio ambiente, no entanto, em 1985, um caso de feohifomicose cerebral em gato causado por esta linhagem foi registrado após o óbito do animal em virtude da doença.

Com esta motivação, este trabalho tem como objetivo montar e gerar a sequência genômica parcial do fungo *Fonsecaea multimorphosa* CBS 980.96<sup>T</sup>. O estudo de genes que conferem patogenicidade ao fungo permitirá compreender os mecanismos envolvidos no comportamento da espécie frente ao hospedeiro.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO ESPECÍFICOS

O presente trabalho teve como objetivo a montagem e análise da sequência genômica do fungo *Fonsecaea multimorphosa* CBS 980.96<sup>T</sup>.

### 2.2. OBJETIVO ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos consistem em:

- Montar os *contigs* do genoma do fungo *F. multimorphosa* CBS 980.96<sup>T</sup>;
- Ordenar os *contigs* obtidos;
- Anotar o genoma montado;
- Montar e anotar o genoma mitocondrial do fungo.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 GÊNERO *Fonsecaea*

Os fungos pertencentes ao grupo das leveduras negras, da família *Herpotrichiellaceae*, possuem alta produção de melanina levando a maior pigmentação, são encontrados nos mais variados ambientes (Eisenman H, Casadevall A 2011; Sun *et al* 2012). São capazes de se adaptar a condições ambientais extremas, como elevada temperatura, alto nível de radiação e baixo pH (Chen *et al* 2014; Vicente *et al* 2013; Zhao *et al* 2010).

Espécies do gênero *Fonsecaea* já foram isoladas de solo, madeira em decomposição, tronco de árvore, bem como de micoses subcutâneas, infecções cerebrais em humanos (Doymaz 2015) e em animais (Najafzadeh *et al* 2011).

Algumas espécies do gênero foram classificadas como patogênicas (Tabela 01), sendo capazes de causar desde infecções cutâneas, subcutâneas até sistêmicas, estando relacionado com uma diversidade de quadros clínicos com alto depósito de melanina na parede celular (Vicente *et al* 2013). O primeiro caso da doença no Brasil foi registrado no ano de 1911 na cidade de São Paulo – SP (Costa 2006). Atualmente no Brasil, o estado do Maranhão é a região com maior registro de cromoblastomicose causada principalmente pelo agente *Fonsecaea pedrosoi*. (Vicente *et al* 2013).

Dentre os fungos patogênicos da família *Herpotrichiellaceae* alguns causam infecção cerebral em seus hospedeiros, chamada de feo-hifomicose cerebral, além das micoses na pele, o que levou os pesquisadores a acreditarem em neurotropismo por parte de algumas dessas espécies (Doymaz 2015).

O neurotropismo consiste na afinidade do microrganismo por células cerebrais. Uma vez que o fungo alcança o sistema nervoso ocorre produção de melanina em excesso levando a inflamação e necrose do tecido cerebral. Os sinais clínicos comumente encontrados em pacientes com feo-hifomicose cerebral são cefaleia severa, convulsão, paralisia de um ou mais músculos oculomotores, perda de peso, entre outros sintomas, levando a óbito o paciente com a doença (Shinwari; Thomas; Orr 1985).

TABELA 01 –ESPÉCIES DO GÊNERO *FONSECAEA* E FONTE DE ISOLAMENTO.

<b>Espécie</b>	<b>Fonte</b>	<b>Linhagens</b>
<i>F. multimorphosa</i>	Cérebro	CBS 980.96 <sup>†</sup>
	Meio ambiente	CBS 102240
		CBS 102224
		CBS 102235
		CBS 102226
		CBS 102253
<i>F. monophora</i>	Cromoblastomicose/Pele	CBS 126716
		CBS 269.37 <sup>†</sup>
		CBS 397.48
		CBS 102242
		CBS 102243
	Cérebro	CBS 102246
		CBS 102248
		CBS 100430
		CBS 115830
		CBS 117236
		CBS 117238
		CBS 117542
	Meio ambiente	CBS 102229
		CBS 102238
		CBS 121721
		CBS 121724
		CBS 121727
<i>F. pedrosoi</i>	Cromoblastomicose/Pele	CBS 123849
		CBS 212.77
		CBS 217.37
		CBS 253.49
		CBS 271.37 <sup>†</sup>
		CBS 285.47
		CBS 342.34
		CBS 102245
		CBS 102247
		CBS 117910
	Meio ambiente	CBS 122740
		CBS 122741
		CBS 122849
		CBS 125749
		CBS 273.66
<i>F. nubica</i>	Cromoblastomicose/Pele	CBS 670.66
		CBS 672.66
		CBS 269.64 <sup>†</sup>
		CBS 277.26
		CBS 121720
		CBS 121733
		CBS 121734
<i>F. erecta</i>	Meio ambiente	CBS 125191
		CBS 444.62
<i>F. brasiliensis</i>	Meio ambiente	CBS 125762 <sup>†</sup>
		CBS 125763
<i>F. pugnacius</i>	Animal	CBS 119710 <sup>†</sup>
	Cérebro	CBS 119718
	Cromoblastomicose/Pele	CBS 127012
<i>F. minima</i>	Meio ambiente	dH 24207
		CBS 139214 <sup>†</sup>
		CBS 126865
		CBS 125760
		CBS 126024

Relação das diferentes fontes de isolamento das espécies de *Fonsecaea*.  
CBS – Centraalbureau voor Schimmelcultures Fungal Biodiversity Centre.  
T – Linhagem tipo.  
FONTE: A autora (2016).

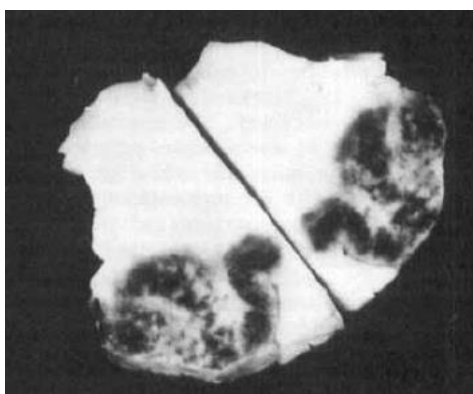
### 3.2 *Fonsecaea multimorphosa* CBS 980.86<sup>T</sup>

Fungos causadores de infecções que alteram a cor da parede celular do hospedeiro para marrom são ditos causadores de cromoblastomicose e em casos de infecção sistêmica, feo-hifomicose (Varghese *et al* 2015).

Casos de feo-hifomicose cerebral são raros em animais e humanos (Najafzadeh *et al* 2011), no entanto relatos da doença tem aumentado, uma vez que diversas espécies foram isoladas de infecções cerebrais, como apresentado na tabela 1. Pacientes imunossuprimidos e com idade avançada são a maioria dos casos, porém a forma de contaminação ainda não está totalmente ilucidada (Suri *et al* 2014; Varghese *et al* 2015).

A linhagem tipo CBS 980.96 de *F. multimorphosa* foi isolada de um gato que apresentava feo-hifomicose cerebral na cidade de Queensland, Austrália, cerca de 25 anos atrás, por M. R. McGinnis. O felino de 18 meses de idade apresentava pupila dilatada com ausência de reflexo, fígado dilatado, ducto biliar inflamado e pulmões congestionados (Shinwari; Thomas; Orr 1985), levando a acreditar que a forma de contaminação tenha sido por via respiratória (Wilson 1982). A lesão estava localizada no lobo occipital esquerdo e media cerca de 2 centímetros por 2,5 centímetros. Na Figura 01 abaixo pode-se ver a foto da necropsia realizada por Shinwari e colaboradores em 1985.

FIGURA 01 – LOBO OCCIPTAL ESQUERDO DO CÉREBRO DO GATO INFECTADO POR *F. multimorphosa* CBS 980.96<sup>T</sup>.



Lesão no lobo occipital esquerdo, sendo a região em preto a região infectada.  
Fonte: Shinwari; Thomas; Orr 1985.

Inicialmente o patógeno foi identificado como *Cladosporium bantianum*, pois apresentava características microscópicas já conhecidas deste fungo. Anos após o isolamento, um novo estudo realizado por Najafzadeh e colaboradores (2011) mostrou, através de análise filogenética (Figura 02) a proximidade do fungo com o gênero *Fonsecaea*. Sendo assim, o gênero e a espécie do fungo encontrado na infecção cerebral do gato foram alterados para *Fonsecaea multimorphosa* CBS 980.96<sup>T</sup>.

### 3.3 SEQUENCIAMENTO GENÔMICO

A técnica de sequenciamento de DNA tem como objetivo determinar a sequência de nucleotídeos de uma molécula de ácido ribonucleico.

Com o passar dos anos e a evolução da tecnologia, o custo para a realização do sequenciamento foi reduzido e as técnicas passaram a ser mais rápidas. Isto resultou na obtenção de maior volume de dados, tornando necessário a criação de banco de dados para armazená-los (Carvalho; Silva 2010).

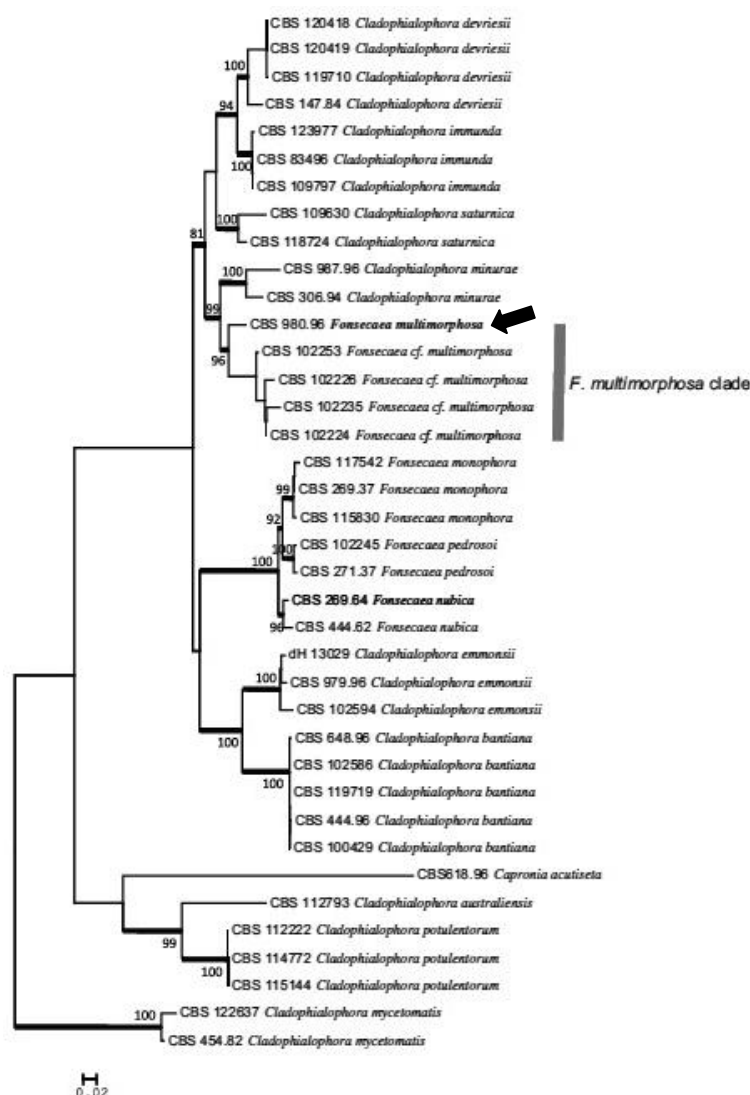
As primeiras publicações sobre a metodologia empregada no sequenciamento foram descritas em 1977 por Frederick Sanger e Alan Coulson, favorecendo o desenvolvimento e aprimoramento da técnica (Liu *et al* 2012). No ano de 1986, o primeiro sequenciador automático foi lançado, o ABI 370 da empresa *Applied Biosystems* (Springer 2006).

Após 18 anos do lançamento do primeiro sequenciador automático, a empresa Roche lançou o sequenciador 454, começando assim a era dos sequenciadores de segunda geração, equipamentos com custo de sequenciamento mais baixo e melhor eficiência, tanto em relação ao tempo de processamento como na qualidade e quantidade de fragmentos (Varuzza 2013). Em 2006 a Illumina, apresentou o sequenciador Solexa e em 2007 é lançado pela Applied Biosystems o SOLiD<sup>TM</sup> (Carneiro 2011).

A técnica do sequenciador Solexa/Illumina é baseada na clonagem do DNA, também conhecido como sequenciamento por síntese (Liu *et al* 2012), utilizando DNA polimerase e nucleotídeos com fluoróforos. O método é realizado através da PCR de fase sólida e o processo de clonagem ocorre diretamente *in vitro*, sobre uma lâmina de vidro (Carvalho; Silva 2010). O sequenciamento inicia-se na extremidade 3', uma vez que esta é a região livre da fita de DNA. As regiões 5' e 3' recebem

adaptadores fixos, que irão favorecer a hibridização do adaptador da região livre (3') (Silveira 2012). As sequências resultantes deste processo são organizadas e montadas para obtenção do genoma do organismo em estudo.

FIGURA 02 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DE APRESENTAÇÃO DA NOVA ESPÉCIE DO FUNGO *Fonsecaea multimorphosa* CBS 980.96<sup>†</sup>.



Árvore filogenética construída com base no conjunto de dados dos genes *ITS*, *BT2* e *TEF1* de mais de 60 leveduras negras.

FONTE: Najafzadeh *et al* 2011.

Novas tecnologias vem sendo desenvolvidas, aprimorando e acelerando o processo de sequenciamento. No ano de 2010, a 3ª geração de sequenciadores foi lançada. As tecnologias Ion Torrent PGM (*Personal Genome Machine*) e PacBio

(*Pacific Bioscience*) trouxeram melhor qualidade aos *reads* sequenciados e maior agilidade à técnica (Liu *et al* 2012; Van Dijk *et al* 2014). Enquanto que a 4ª geração de sequenciadores trouxe equipamentos portáteis, como o MinION da Oxford Nanopore, disponibilizado em 2015, mas mantendo a capacidade de resultar *reads* longos (Jain *et al* 2015).

### 3.4 MONTAGEM DE GENOMA

A genômica é a ciência que estuda genomas, tendo por objetivo organizar as sequências de DNA resultantes dos sequenciadores montando a sequência completa dos cromossomos presentes no organismo em estudo (Ribeiro 2012). A montagem consiste em organizar os *contigs* (pequenos fragmentos) (Baker 2012), através de sobreposição por semelhança entre os pares de base, com o propósito de formar *scaffolds*/supercontigs (regiões maiores) (Hotopp *et al* 2007).

As sequências obtidas são submetidas aos *softwares* de montagem e estes fazem a sobreposição por meio de alinhamento, para que supercontigs sejam formados, tendo ao final da montagem maiores regiões de sequências unidas (Lu *et al* 2014).

Duas diferentes abordagens de montagem podem ser usadas. A primeira usa o genoma de um organismo de referência e a segunda é a montagem *de novo*. A primeira consiste no alinhamento dos *reads* do novo genoma junto a um organismo com genoma já finalizado, assim a nova sequência é construída com base na ordem dos *scaffolds* do organismo modelo. O diferencial da montagem *de novo* está na ausência de referência (Figura 03), ou seja, o genoma é montado a partir dos *reads* resultantes do sequenciamento, evitando que erros presentes na referência se repitam no novo genoma (Boetzer *et al* 2010).

Após a montagem, os *contigs* resultantes são ordenados baseados em um genoma já pronto e que apresente proximidade ao organismo em estudo. Ao final da ordenação, os *contigs* estarão organizados e passarão para o fechamento das lacunas, ou *gaps* como também são chamados, presentes entre os *contigs*, com o objetivo de ao final dessa etapa reduzir a quantidade de pequenos fragmentos e aumentar o número de *scaffolds*, regiões maiores (Lu *et al* 2014).



Algumas ferramentas como FGAP (Piro *et al* 2014), Sealer (Paulino *et al* 2015), GMcloser (Kosugi, Hirakawa e Tabata 2015) e GapFiller (Nadalin, Vezzi e Policriti 2012), unem os *contigs* automaticamente.

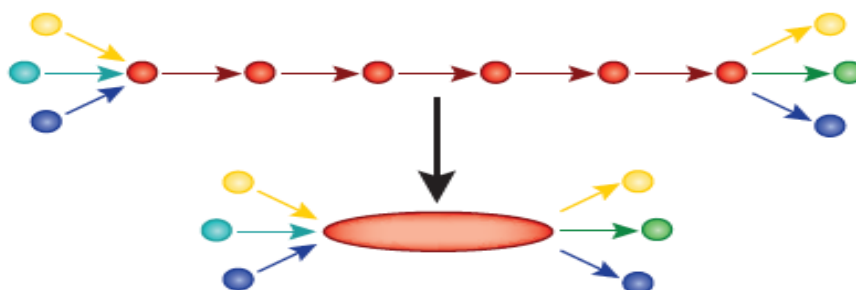
Durante o processo de montagem um passo importante é o alinhamento da sequência em estudo com um genoma conhecido, escolhido por meio da proximidade filogenética, buscando encontrar similaridade entre os organismos por meio de comparação de aminoácidos ou nucleotídeos. O alinhamento pode ser global ou local. No alinhamento global a sequência é totalmente alinhada, sendo indiferente quanto aos *gaps* formados. Já o alinhamento local sempre buscará as regiões com maior similaridade, reduzindo assim o número de *gaps*, uma vez que o tamanho das sequências alinhadas já não está em questão (Verli (org) 2014).

Usando o alinhamento de sequência pode-se também montar o DNA mitocondrial (mtDNA), uma vez que este é sequenciado junto com o DNA cromossomal e normalmente não tem seu genoma identificado. A importância de definir a região mitocondrial está na diferenciação da estrutura da molécula, sendo esta circular, e também aos diversificados tamanhos de mtDNA já encontrados. A variedade no tamanho molecular destas organelas está ligada às variações nas regiões interagências do genoma (Sande 2012).

Para finalizar a montagem de um genoma é realizada a anotação do organismo, que consiste na localização das proteínas, para assim integrar funções biológicas ao genoma. A anotação é realizada em ferramentas automáticas que localizam ORFs (*Open Read Frames* – Fase de leitura entre o códon de início e o de fim) como GeneMark (Besemer 2001), e outros programas como RAFTS3 (Guizelini D., Vialle R., 2014), BLAT (Kent 2002), InterProScan (Quevillon *et al* 2005) que fazem busca de similaridade através de alinhamento de sequências já anotadas usando o *software* BLAST (Altschul *et al* 1990).

FIGURA 03 – MONTAGEM *DE NOVO* DE GENOMA.**1. Reads****2. Busca por sobreposição dos reads**

...AGCCTAGACCTACAGGATGCGCGACACGT  
 GGATGCGCGACACGT CGCATATCCGGT..

**3. Montagem das sobreposições em contigs****4. Montagem dos contigs em scaffolds**

FONTE: Adaptado de Baker 2012.

Etapas da montagem de genoma utilizando a metodologia *De novo*. 1. Fragmentos de DNA após o sequenciamento; 2. Procura por regiões de sobreposição entre as sequências; 3. Montagem dos *contigs* com base nas sobreposições encontradas nos *reads*; 4. Organização dos *contigs* afim de obter *scaffolds*.

FONTE: Adaptado de Baker 2012.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. SERVIDOR

As análises realizadas durante o projeto foram feitas no servidor disponibilizado pelo Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, acessado de computador pessoal via terminal.

### 4.2. FERRAMENTAS UTILIZADAS

As ferramentas utilizadas para a montagem do genoma da *Fonsecaea multimorphosa* CBS 980.96<sup>T</sup> estão listadas na Tabela 02.

TABELA 02 – FERRAMENTAS UTILIZADAS PARA A MONTAGEM DO GENOMA DA *Fonsecaea multimorphosa* CBS 980.96<sup>T</sup>.

Nome da ferramenta	Versão	Função
Aragorn	1.2.36	Identificador de tRNA
Artemis	10.2	Visualizador de sequência e anotação
BLAST	2.2.31	Buscador de regiões similares entre sequências biológicas
Blat	35	Alinhador de sequência biológica
Bowtie2	2.1.0	Alinhador de sequência ( <i>reads</i> )
Celera	8.3rc1	Montador <i>de novo</i> de sequência de DNA
DNA plotter	10.2	Gerador de imagem de DNA circular ou linear
FASTQC	0.11.3	Análise de qualidade de <i>reads</i> de sequenciamento
FGAP	1.8	Ferramenta de fechamento automático de <i>gap</i>
GeneMark-ES	4.29	Identificação de <i>Open Reading Frame</i>
InterProScan	2.0	Anotação de proteínas
KEGG/KAAS	-	Análise das vias metabólicas
MaSuRCA	2.3.2	Montador de sequência de DNA
MIRA	4.0.2	Montador e mapeador de genoma
Mummerplot	3.5	Ferramenta de alinhamento rápido
Nucmer	3.1	Ferramenta de alinhamento múltiplo de sequência nucleotídica
SPAdes	3.6.2	Montador de sequência de DNA
Tablet	1.15.09.01	Visualizador de alta performance

FONTE: A autora (2016).

#### 4.3. MONTAGEM E ORDENAÇÃO

Diversos montadores como MIRA (Chevreux et al. 2016), Celera (Walenz 2008), MaSuRCA (Zimin et al 2013) e SPAdes (Bankevich et al 2012) foram utilizados para a montagem.

O resultado obtido com o montador SPAdes apresentou maior cobertura e uso de *reads* para realizar a montagem, bem como menor número de *contigs* em relação às demais montagens, sendo este resultado o escolhido para trabalho.

Estes *contigs* foram ordenados com a função 'alinhtgsrcf', função desenvolvida e disponibilizada pelo Professor Doutor Roberto T. Raittz, no *software* MATLAB – *Matrix Laboratory* (The MathWorks® 2016), usando como referência o genoma do fungo *Fonsecaea multimorphosa* CBS 102226, amostra isolada de madeira em decomposição (National Center for Biotechnology Information (NCBI) 2015a).

#### 4.4. MAPEAMENTO

Com a finalidade de checar a qualidade da montagem em relação aos *reads* brutos resultantes do sequenciamento, o mapeamento foi realizado com o *software* Bowtie2 (Langmead; Salzberg 2012) e visualizado com a ferramenta TABLET (Milne et al 2012).

#### 4.5. FECHAMENTO DE GAP

A fim de reduzir o número de *contigs* e aumentar o número de *scaffolds* do genoma, utilizou-se a ferramenta FGAP (*An automated gap closing tool*), desenvolvida pelo Laboratório de Bioinformática da UFPR, para fechar as lacunas entre um *contig* e outro (Piro et al 2014).

O *software* consiste na diminuição de lacunas entre os *contigs* de forma rápida utilizando como *dataset* outras montagens disponibilizadas pelo usuário. Após realizar o alinhamento dos *contigs* do genoma com as sequências disponibilizadas pelo usuário usando o BLAST (Altschul et al 1990), o algoritmo seleciona a sequência que melhor se encaixa para unir um *contig* ao outro (Piro et al 2014).

#### 4.6. ANOTAÇÃO

A fase de anotação foi realizada em três etapas.

A primeira realizada com o programa GeneMark-ES versão 4.29 (Besemer 2001), com o objetivo de identificar as ORFs (*Open Read Frames* – Fase de leitura entre o códon de início e o de fim) e as *CDS* (*Coding Sequence* - Sequência Codificadora de Proteínas) e visualizado no *software* Artemis (Rutherford *et al* 2000).

A etapa seguinte consistiu em anotar o genoma em estudo *versus* o banco de dados de proteínas já anotadas de leveduras negras em estudo no CBS (*Fungal Biodiversity Centre* – Centro de Biodiversidade Fúngica), usando as ferramentas RAFTS3 (Rapid Alignment Free Tool for Sequences Similarity Search) e BLAT (*BLAST-Like Alignment Tool*) (Kent 2002).

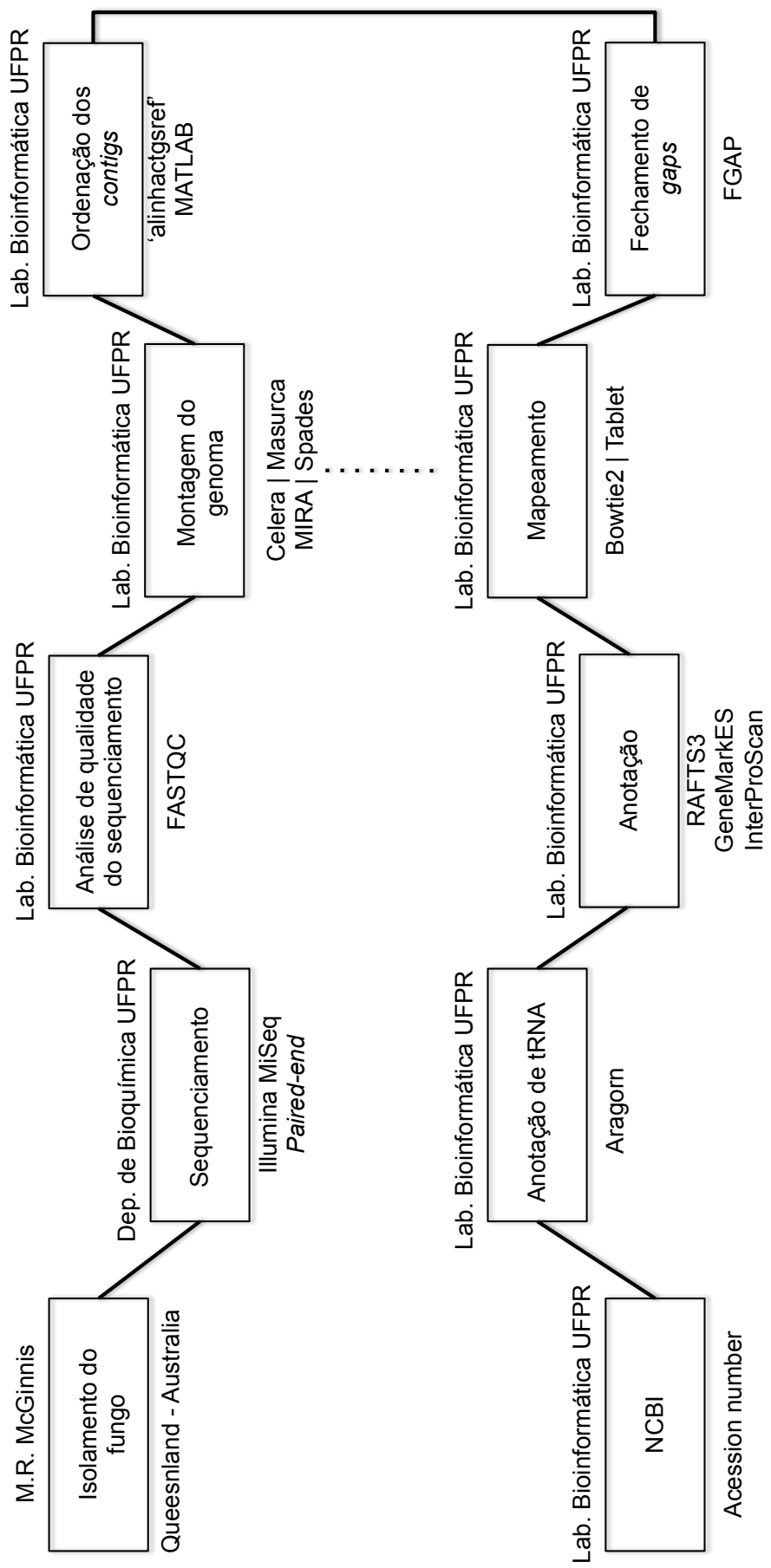
Para o reconhecimento de proteínas e obtenção dos termos de ontologia de gene (GO - *Gene Ontology*) (Ashburner *et al* 2000) em cada *contig* do genoma, foi utilizada a ferramenta InterProScan5 versão 2.0 (Quevillon *et al* 2005).

O *software* Aragorn versão 1.2.36 (Laslett 2004) foi utilizado para a localização das regiões de RNA transportador (tRNA).

#### 4.7. FLUXOGRAMA DO TRABALHO

Abaixo na Figura 04 encontram-se todas as etapas realizadas na montagem do genoma do fungo em estudo.

FIGURA 04 – FLUXOGRAMA DO TRABALHO REALIZADO DURANTE A MONTAGEM DO GENOMA TOTAL DO FUNGO *F. multimorphosa* CBS 980.96<sup>T</sup>.



Etapas realizadas durante a montagem do genoma. Na parte superior dos retângulos encontram-se os locais ou os responsáveis pela realização de cada etapa do trabalho. Na parte inferior estão relacionados os *softwares* empregados em cada umas das análises.  
FONTE: A autora (2016).

#### 4.8. MONTAGEM DO GENOMA MITOCONDRIAL

A montagem foi realizada através da seleção dos *reads* pertencentes ao DNA mitocondrial do conjunto total de *reads*. A separação foi realizada através do alinhamento dos *reads* utilizando o *software* Bowtie2 (Langmead; Salzberg 2012) e ao DNA mitocondrial do fungo *Fonsecaea pedrosoi* CBS 271.37 (National Center for Biotechnology Information (NCBI), 2015b). A opção '--al-conc' foi usada para que fossem criados dois arquivos com apenas os *reads* alinhados. Estes arquivos resultantes do alinhamento foram usados para realizar a montagem no montador SPAdes versão 3.6.2 (Bankevich *et al* 2012), para a obtenção dos *contigs*.

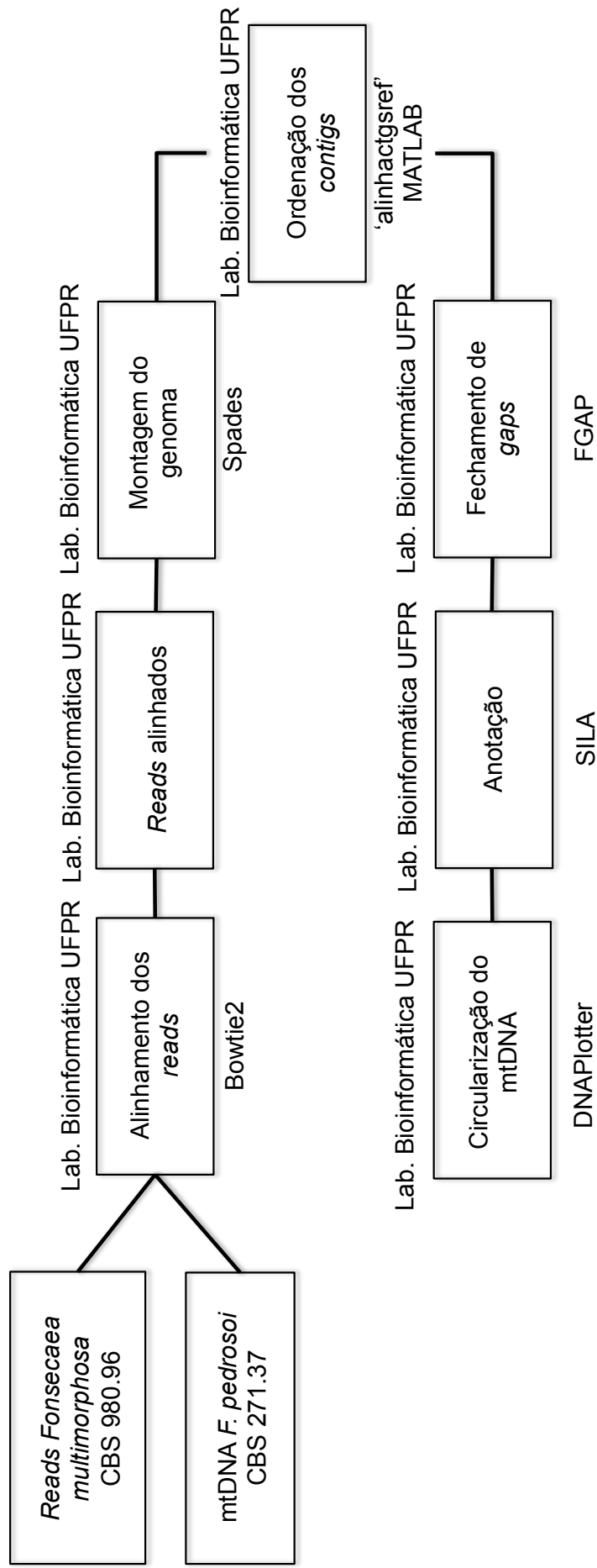
Após a montagem, os *contigs* foram ordenados com a função 'alinhactgsref' do MATLAB (The MarthWorks® 2016), utilizando o DNA mitocondrial da *Fonsecaea pedrosoi* CBS 271.37 como referência. O genoma ordenado foi submetido ao fechamento de gap utilizando a ferramenta FGAP (Piro *et al* 2014).

Com o resultado do fechamento de lacunas (*gaps*), o genoma foi anotado usando o NCBI. A circularização foi realizada no programa DNAPlotter. Para a análise filogenética mitocondrial foram usados fungos do mesmo gênero, sendo eles: *F. erecta* CBS 125763, *F. monophora* CBS 269.37, *F. nubica* CBS 269.64 e *F. pedrosoi* CBS 271.37. Com exceção do genoma mitocondrial do fungo *F. pedrosoi*, os demais foram montados no Laboratório de Bioinformática da UFPR.

#### 4.9. FLUXOGRAMA DA MONTAGEM DO GENOMA MITOCONDRIAL

Abaixo na Figura 05 encontram-se todas as etapas realizadas para a montagem do genoma mitocondrial do fungo em estudo.

FIGURA 05 – FLUXOGRAMA DA MONTAGEM DO GENOMA MITOCONDRIAL DO FUNGO *Fonsecaea multimorphosa* CBS 980.96<sup>T</sup>.



Etapas realizadas durante a montagem do genoma mitocondrial usando como referência o DNA mitocondrial da espécie *Fonsecaea pedrosoi* CBS 271.37. Na parte superior dos retângulos encontram-se os locais ou os responsáveis pela realização de cada etapa do trabalho. Na parte inferior estão relacionados os *softwares* empregados em cada uma das análises.  
 FONTE: A autora (2016).



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 DADOS BRUTOS

A amostra do fungo em estudo foi obtida através de isolamento do abscesso cerebral de uma gata castrada de 18 meses na Austrália por M. R. McGinnis.

A extração do DNA foi realizada no Laboratório de Microbiologia, no Departamento de Patologia da Universidade Federal do Paraná, seguindo o protocolo de Vicente e colaboradores (2008).

A purificação também foi feita no Laboratório de Microbiologia, utilizando as instruções recomendadas pelo fabricante do kit Microbial DNA UltraClean®.

O sequenciamento da amostra foi realizado pela equipe técnica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná e foram cedidos para este trabalho em arquivos com formato *fastq*.

Ambas as corridas foram realizados dois sequenciamentos no sequenciador Illumina – MiSeq, com biblioteca *paired-end*.

A Tabela 03 apresenta os dados de sequenciamento do genoma *Fonsecaea multimorphosa* CBS 980.96<sup>T</sup>.

TABELA 03 – RESULTADO DOS SEQUENCIAMENTOS REALIZADOS NO SEQUENCIADOR ILLUMINA – MISEQ.

Sequenciamento	Total de <i>reads</i> gerados
Sequenciamento_1A	894.445
Sequenciamento_1B	894.445
Sequenciamento_2A	2.818.106
Sequenciamento_2B	2.818.106
<b>TOTAL</b>	<b>7.445.102</b>

FONTE: A autora (2016).

### 5.2 MONTAGEM DO GENOMA TOTAL

Os resultados obtidos dos diferentes montadores encontram-se na Tabela 04.

TABELA 04 – RESULTADO OBTIDOS COM OS MONTADORES USADOS.

Montador	Contigs >1000pb	Número de contigs gerados	Nº de pares de base (pb)
MIRA <sup>1</sup>	6.837	8806	34.374.761pb
MaSuRCA <sup>2</sup>	436	462	33.532.214pb
Celera <sup>3</sup>	692	692	33.156.941pb
SPAdes <sup>4</sup>	288	288	33.393.629pb

MIRA<sup>1</sup> – montador, mapeador de genoma e RNASeq (Chevreux et al. 2016); MaSuRCA<sup>2</sup> – montador de genoma que combina técnica de Gráfico de Bruijn e Sobreposição (Zimin *et al* 2013); Celera<sup>3</sup> – montador *de novo* de genoma (Walenz 2008); SPAdes<sup>4</sup> – montador de genoma, suporta sequências derivadas dos sequenciadores Illumina, IonTorrent, PacBio, Oxford Nanopore e Sanger (Bankevich *et al* 2012).

FONTE: A autora (2016).

O melhor resultado obtido em relação ao tamanho da montagem e qualidade foi com o montador SPAdes (Bankevich *et al* 2012). As demais montagens foram utilizadas na etapa de fechamento de *gaps* entre os *contigs*, como banco de dados.

### 5.3 FECHAMENTO DE GAP

Após o fechamento dos *gaps* do genoma, o número de *contigs* passou de 288 para 163, com 33.393.629 pb. Como *dataset* para o fechamento das *gaps* foram usadas as montagens obtidas pelos demais montadores.

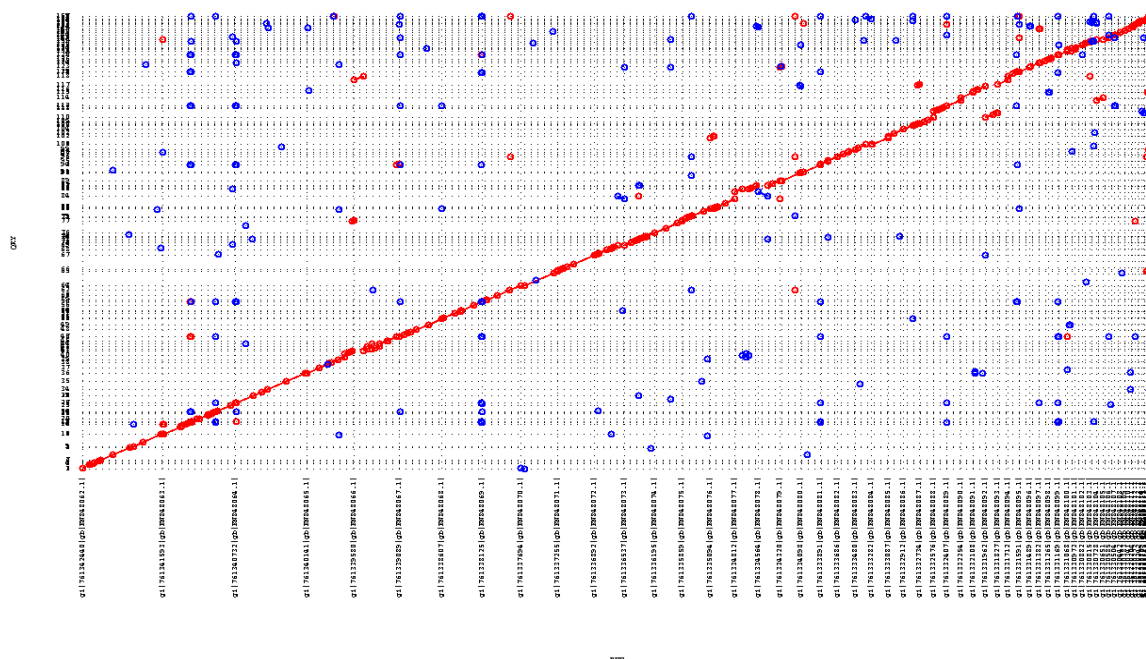
Após o fechamento dos *gaps*, o mapeamento foi realizado afim de saber a porcentagem de *reads* presentes no genoma em relação aos *reads* gerados pelo sequenciamento. Resultando no uso de 98% dos *reads* brutos para montagem do genoma.

### 5.4 DOTPLOT

O alinhamento do genoma do fungo em estudo foi realizado com a ferramenta Mummerplot, com o objetivo de comparar a montagem do genoma *F. multimorphosa* CBS 980.96<sup>T</sup> e resultou na Figura 06. O alinhamento foi feito utilizando o genoma de *F. multimorphosa* CBS 102226 (acesso [PRJNA233317](#)) como referência, fungo isolado do meio ambiente, único da espécie com genoma montado e depositado no banco de dados do NCBI.

O resultado obtido com o alinhamento das montagens mostra a alta similaridade entre os organismos.

FIGURA 06 – GENOMA DE *F. multimorphosa* CBS 980.96<sup>T</sup> ALINHADO COM O GENOMA DO FUNGO *F. multimorphosa* CBS 102226.



Em vermelho estão representadas as regiões de similaridade entre os dois genomas. No eixo Y estão os *contigs* do fungo *F. multimorphosa* CBS 980.96<sup>T</sup> e no eixo X os 67 *scaffolds* do organismo *F. multimorphosa* CBS 102226.  
 FONTE: A autora (2016).

## 5.5 ANOTAÇÃO

A anotação realizada com a ferramenta RAFTS3, utilizando o banco de dados de proteínas já anotadas de leveduras negras em estudo no CBS, resultou em 11.772 genes codificadores de proteínas, sendo que 11.341 não possuem função conhecida, chamadas de proteínas hipotéticas, e 431 proteínas têm função predita.

O gênero *Fonsecaea* possui espécies tanto patogênicas como não patogênicas. A diferenciação entre elas está na presença ou não de genes que conferem patogenicidade ao fungo (APÊNDICE 1). Uma vez que a linhagem sequenciada neste trabalho é capaz de produzir doença, nesta etapa genes já conhecidos relacionados a patogenicidade foram identificados e analisados.

As proteínas de choque térmico – *HSP* (*Heat shock proteins*) - são responsáveis por conferem termotolerância aos organismos patogênicos, além de proteger contra apoptose e outras situações de estresse (Gibney *et al* 2013; Verghese *et al* 2012). As proteínas desta família são classificadas conforme o peso molecular, onde a numeração corresponde ao peso em kDa (Li e Srivastava 2004).

Estão presentes no genoma de *F. multimorphosa* CBS 980.96<sup>T</sup> as proteínas *HSP72*, *HSP90* e *HSP98*, localizadas nos *contigs* 62, 64 e 35, respectivamente.

As leveduras negras têm como característica a coloração escura devido ao alto nível de melanina produzida pelo fungo. A elevada produção de melanina pelo patógeno se dá como mecanismo de defesa, uma vez que esta possibilita proteção contra a dissecação, radiação solar, fagocitose, ação antifúngica, entre outros fatores de degradação (Pihet *et al.* 2009). Genes para enzimas da via de síntese da melanina dihidroxinaftaleno (DHN melanina) foram localizadas no genoma de *F. multimorphosa* CBS 980.96<sup>T</sup> como a esquitona desidratase, 1,3,8-triidroxinaftaleno redutase e homogentisato-1,2-dioxigenase, nos *contigs* 132, 108 e 76, respectivamente (Eisenman; Casadevall 2011; Sun *et al* 2012). A DHN melanina tem como característica o alto peso molecular e hidrofobicidade (Sun *et al* 2012).

Em 2015, Azevedo e colaboradores estudando genes de algumas linhagens de leveduras negras não encontraram o controlador de divisão celular 42 (*CDC42*) em *F. multimorphosa* CBS 980.96<sup>T</sup>. Após anotação realizada neste trabalho, destacou-se a presença do mesmo, no *contig* 66 entre os pares de base 507.596 – 508.568. Este gene codifica uma proteína de 235 aminoácidos que esta associada a diferenciação morfológica nas leveduras negras, ou seja, *CDC42* tem como função a formação de corpos muriformes, tipo celular comumente encontrado em hospedeiros com infecção ocasionada por estas leveduras (Xie *et al* 2011).

Além dos 11.772 genes anotados, também foram localizados os genes de RNA transportadores, totalizando 33 genes de tRNAs anotados. O resultado com a localização de cada um encontra-se na Tabela 05.

As regiões de RNA ribossomal 18S, 5.8S, e 28S e as regiões *ITS2* e *ITS1*, foram parcialmente identificadas utilizando as sequências já depositadas no NCBI. Estas sequências foram encontradas no *contig* 84, sendo duas regiões parciais do gene 28S rRNA e uma região dos demais genes ribossomais.

TABELA 05 – LOCALIZAÇÃO DOS tRNAs NO GENOMA DE *F. multimorphosa* CBS 980.96<sup>T</sup>.

<b>Contig</b>	<b>tRNA</b>	<b>Anti códon</b>
<i>Contig 1</i>	Gln	TTG
	Leu	TAG
	Phe	GAA
	Ala	TGC
	Leu	TAA
	Arg	TCG
	Met	CAT
	Asn	GTT
	His	GTG
	Val	TAC
	Met	CAT
	Glu	TTC
<i>Contig 2</i>	Cys	GCA
<i>Contig 8</i>	Glu	CTC
<i>Contig 24</i>	Arg	GCG
<i>Contig 35</i>	Glu	TTC
<i>Contig 68</i>	Gly	CCC
	Ala	TGC
<i>Contig 69</i>	Pro	TGG
<i>Contig 74</i>	Lys	TTT
	Tyr	GTA
	Arg	TCT
	Met	CAT
	Pro	TGG
	Gly	TCC
	Ser	TCA
	Ile	GAT
<i>Contig 78</i>	Gln	CTG
<i>Contig 83</i>	Gly	GCC
	Gln	TTG
<i>Contig 132</i>	Tyr	GTA
<i>Contig 151</i>	Arg	ACG
<i>Contig 156</i>	Lys	CTT

Relação dos RNAs transportadores encontrados nos *contigs* do genoma e seus respectivos aminoácidos. Arg – Arginina; Met – Metionina; Asn – Asparagina; His – Histidina; Val – Valina; Glu – Glutamato; Ser – Serina; Ile – Isoleucina; Gly – Glicina; Pro – Prolina; Tyr – Tirosina; Lys – Lisina; Cys – Cisteína; Gln – Glutamina; Leu – Leucina; Phe – Fenilalanina; Ala – Alanina.

FONTE: A autora (2016).

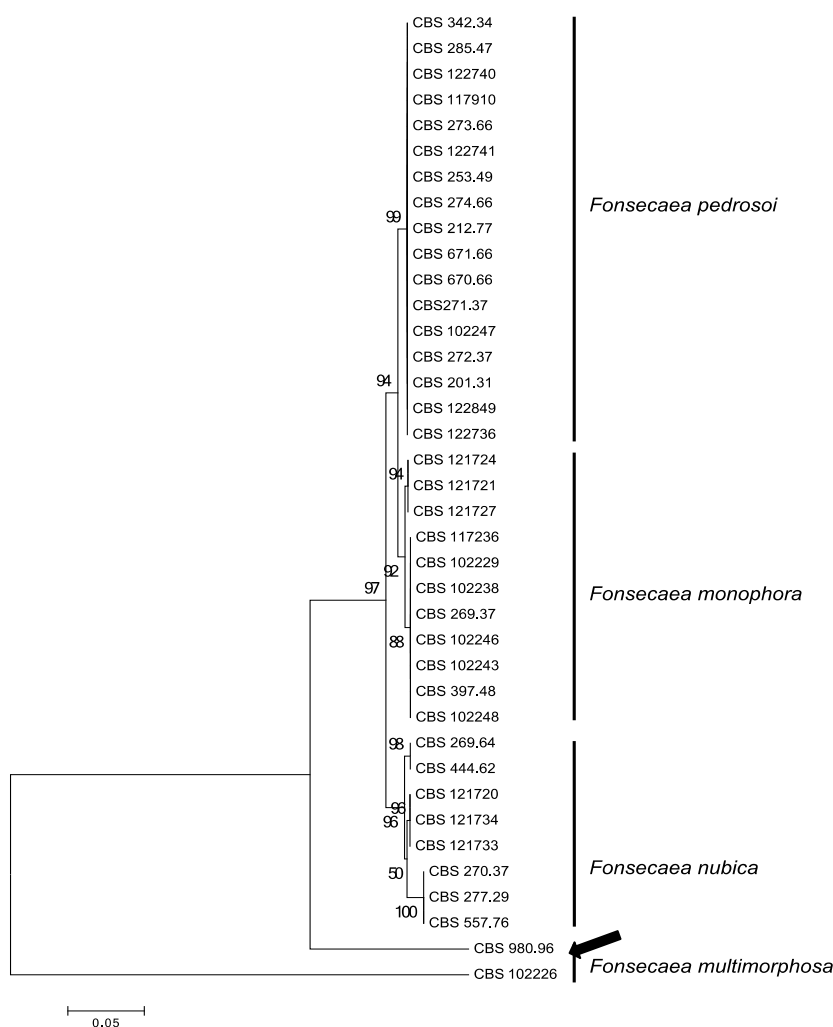
## 5.6 COMPARAÇÃO FILOGENÉTICA

A Figura 07 apresenta o dendrograma dos fungos *F. pedrosoi*, *F. monophora*, *F. nubica* e *F. multimorphosa* baseado no gene *CDC42* (Controle de Divisão Celular 42), com a finalidade de comparar com a análise realizada por Sun e colaboradores em 2012.

A estrutura da árvore manteve-se a mesma da descrita por Sun e colaboradores em 2012, com a distribuição das linhagens em três ramos principais que diferenciam as espécies patogênica *F. pedrosoi*, *F. monophora* e *F. nubica*. *F.*

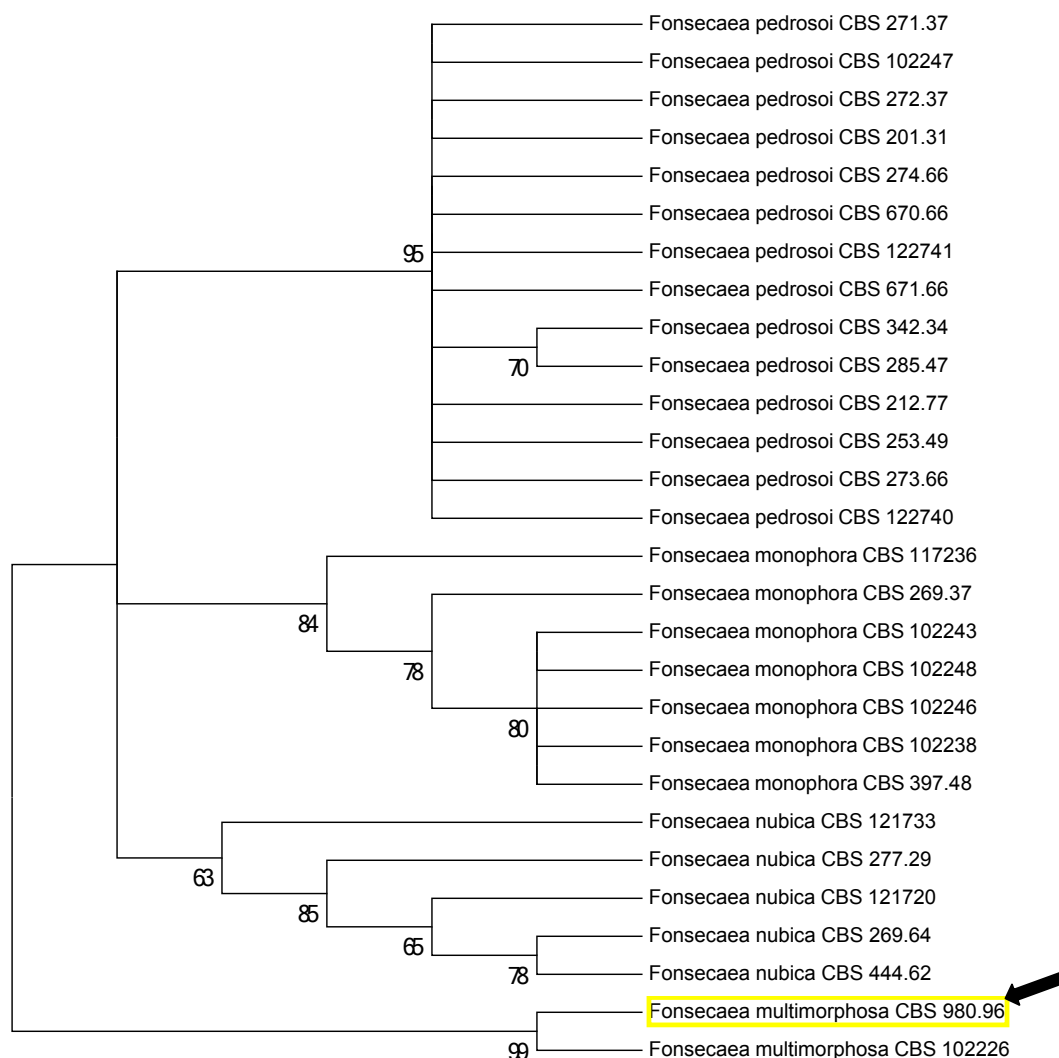
*multimorphosa* CBS 980.96<sup>T</sup>, isolada de lesão de felino e sequenciada neste trabalho, aparece em um novo ramo, formando um grupo com uma única linhagem (Figura 07). Interessantemente, a linhagem ambiental de *F. multimorphosa* CBS 102226 foi posicionada fora do grupo de linhagens patogênicas. Este resultado contrasta com o dendrograma (Figura 08) construído com as sequências *ITS*, que agrupa as duas linhagens de *F. multimorphosa*. Juntos, os resultados sugerem que a linhagem CBS 980.96<sup>T</sup> pode ter adquirido gene *CDC42* de maior virulência.

FIGURA 07 – RELAÇÃO FILOGENÉTICA DO GENE *CDC42* ENTRE ALGUMAS ESPÉCIES DE *FONSECAEA*.



Dendrograma construído no *software* MEGA6.0, método Máximo verossimilhança de distância evolucionária e *bootstrap* de 500 baseado na região do gene *CDC42* (*Cell Division Control* 42) ligado a patogenicidade dos fungos das espécies *Fonsecaea monophora*, *Fonsecaea multimorphosa*, *Fonsecaea nubica* e *Fonsecaea pedrosoi*. Em destaque a *Fonsecaea multimorphosa* CBS 980.96<sup>T</sup>.  
 FONTE: A autora (2016).

FIGURA 08 – RELAÇÃO FILOGENÉTICA DO GENE *ITS* ENTRE ALGUMAS ESPÉCIES DE *FONSECAEA*.



Dendrograma construída no *software* MEGA6.0, método Máximo verossimilhança de distância evolucionária e *bootstrap* de 500 baseado, na região do gene *ITS* (*Internal Transcribed Spacer*) dos fungos das espécies *Fonsecaea monophora*, *Fonsecaea multimorphosa*, *Fonsecaea nubica* e *Fonsecaea pedrosoi*. Em destaque a *Fonsecaea multimorphosa* CBS 980.96<sup>T</sup>.  
 FONTE: A autora (2016).

## 5.7 GENOMA FINAL

O resultado da montagem do genoma está dentro do esperado quando comparado aos demais fungos da espécie, tanto em relação ao seu tamanho como em quantidade de proteínas anotadas. A Tabela 06 apresenta um resumo da montagem final do genoma.

TABELA 06 – RESUMO FINAL DA MONTAGEM DO GENOMA DO FUNGO *F. multimorphosa* CBS 980.96<sup>T</sup>.

<b>Genoma</b>	<b><i>Fonsecaea multimorphosa</i> CBS 980.96<sup>T</sup></b>
<b>Contigs</b>	163
<b>Tamanho do genoma (Mbp)</b>	33.4
<b>Pares de base (pb)</b>	33.393.629
<b>Cobertura</b>	54X
<b>GC%</b>	52.6%
<b>tRNA</b>	33
<b>Total de genes</b>	11.772

FONTE: A autora (2016).

## 5.8 GENOMA MITOCONDRIAL

Após a montagem e ordenação dos *contigs*, o fechamento das lacunas foi realizado no FGAP, passando de 10 *contigs*, resultantes da montagem no SPAdes, para 7 *contigs*. Na Tabela 07 são apresentadas as informações sobre o genoma mitocondrial após o fechamento dos *gaps*.

TABELA 07 – RESULTADOS OBTIDOS NA MONTAGEM DO DNA MITOCONDRIAL DO FUNGO *Fonsecaea multimorphosa* CBS 980.96<sup>T</sup>.

<b>Genoma</b>	<b><i>Fonsecaea multimorphosa</i> CBS 980.96<sup>T</sup></b>
<b>Contigs</b>	7
<b>Pares de base (pb)</b>	26.440
<b>GC%</b>	27,7%
<b>tRNA</b>	25
<b>Total de genes</b>	19

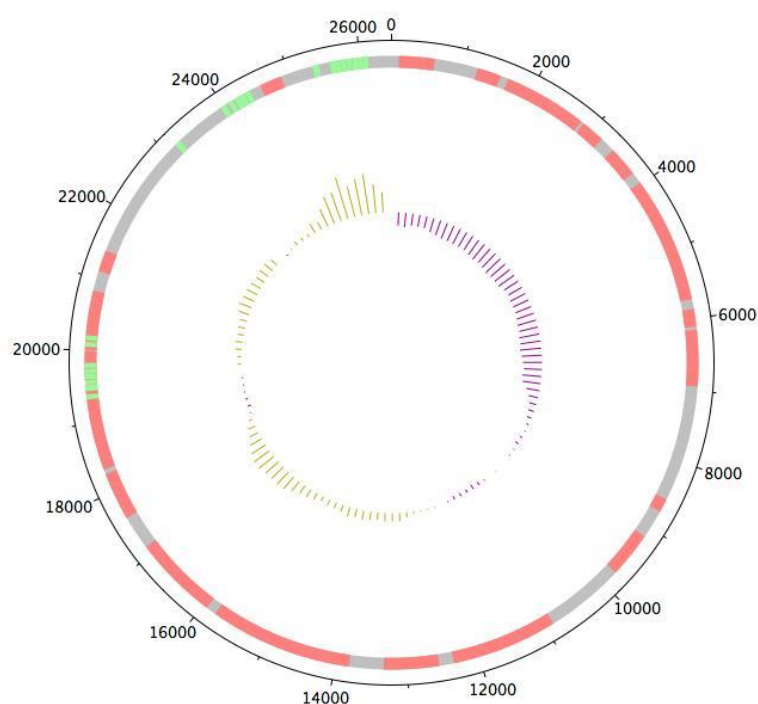
FONTE: A autora (2016).

O mtDNA montado tem o tamanho esperado em relação ao de outros fungos já montados. O genoma mitocondrial de leveduras negras como *F. erecta* CBS 125763, *F. monophora* CBS 269.37, *F. nubica* CBS 269.64, *F. pedrosoi* CBS 271.37, *Exophiala dermatitidis* NIH:UT8656 possui tamanho médio de 25.000 pb.

A estrutura linear do genoma de eucariotos não corresponde ao das mitocôndrias, pois estas possuem estrutura circular e por esta razão são representadas de forma diferente, como na Figura 09.



FIGURA 09 – GENOMA MITOCONDRIAL CIRCULARIZADO.



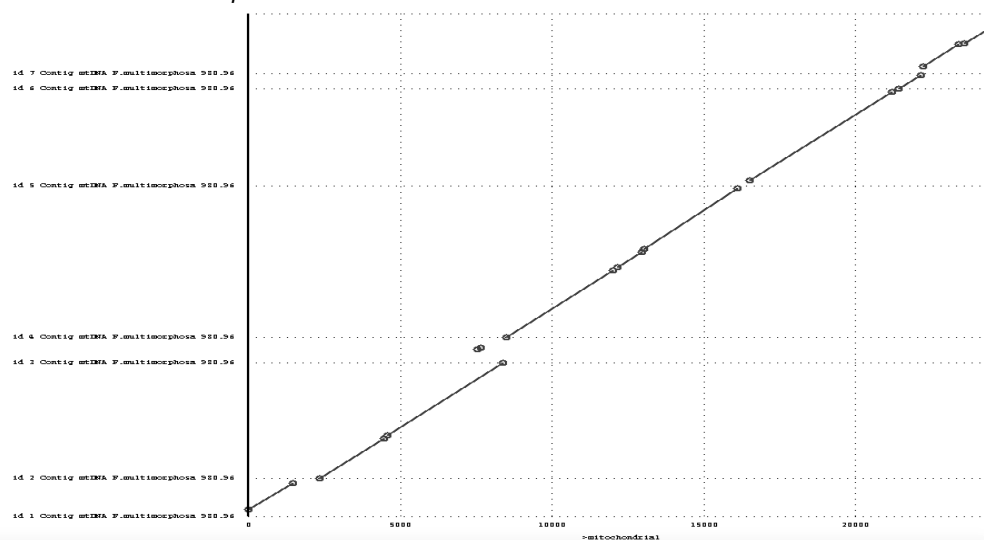
DNA mitocondrial da levedura *F. multimorphosa* CBS 980.96<sup>1</sup> circularizado no *software* DNAPlotter após anotação no NCBI. De fora para dentro: o primeiro círculo representa as posições dos genes, onde cinza é a sequência de pares de base, a cor rosa representa os genes em suas posições e em verde os tRNA; o círculo interno apresenta o conteúdo G+C presente no organismo.  
 FONTE: A autora (2016).

## 5.9 DOTPLOT

O alinhamento do genoma mitocondrial do fungo em estudo com o organismo *F. pedrosoi* CBS 271.37 foi realizado com a ferramenta Mummerplot e resultou a Figura 10.

O *dotplot* resultante mostra alta similaridade entre os genomas mitocondriais.

FIGURA 10 – GENOMA MITOCONDRIAL DE *F. multimorphosa* CBS 980.96<sup>T</sup> ALINHADO COM O GENOMA DO FUNGO *F. pedrosoi* CBS 271.37.



As linhas na diagonal representam as regiões de similaridade entre os dois genomas mitocondriais. No eixo Y estão os *contigs* do fungo *F. multimorphosa* CBS 980.96<sup>T</sup> e no eixo X o genoma mitocondrial do fungo *F. pedrosoi* CBS 271.37.

FONTE: A autora (2016)

## 5.10 ANOTAÇÃO

A anotação dos genes codificadores de proteínas do genoma mitocondrial indicou que apenas 26% dessas são hipotéticas, sem função conhecida. Já os 74% restantes codificam proteínas relacionadas à produção de energia e à respiração celular. Na Tabela 08 encontra-se o resultado da anotação.

TABELA 08 – RELAÇÃO DA QUANTIDADE DE PROTEÍNAS ANOTADAS NO GENOMA MITOCONDRIAL DO FUNGO *F. multimorphosa* CBS 980.96<sup>T</sup>.

Proteínas	Quantidade
ATP sintase	3
Citocromo b	1
Citocromo c oxidase	3
NADH desidrogenase	6
Proteína hipotética	5
rRNA	1
<b>Total</b>	<b>19</b>

Proteínas anotadas no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

FONTE: A autora (2016).

Foram identificados 25 tRNA utilizando a ferramenta Aragorn, na Tabela 09 encontra-se a relação dos aminoácidos identificados e a respectiva quantidade de cada um.

TABELA 09 – RELAÇÃO AMINOÁCIDOS DOS tRNAs DO GENOMA MITOCONDRIAL DO FUNGO *F. multimorphosa* CBS 980.96<sup>T</sup>.

<b>Contig</b>	<b>tRNA</b>	<b>Anti códon</b>
<i>Contig 1</i>	Thr	TGT
	Glu	TTC
	Met	CAT
	Val	TAC
	His	GTG
	Asn	GTT
	Met	CAT
	Arg	TCG
<i>Contig 2</i>	Ser	TGA
<i>Contig 4</i>	Lys	TTT
	Tyr	GTA
	Arg	TCT
	Met	CAT
	Pro	TGG
	Gly	TCC
	Asp	GTC
	Ser	GCT
	Trp	TCA
	Ile	GAT
<i>Contig 5</i>	Cys	GCA
<i>Contig 7</i>	Leu	TAA
	Ala	TGC
	Phe	GAA
	Thr	TAG
	Gln	TTG

Relação dos RNAs transportadores encontrados nos *contigs* do genoma mitocondrial e seus respectivos aminoácidos e anti-códon. Ala – Alanina; Arg – Arginina; Asn – Asparagina; Asp – Ácido aspártico; Cys - Cisteína; Gln – Glutamina; Glu – Glutamato; Gly – Glicina; His – Histidina; Ile – Isoleucina; Leu – Leucina; Lys – Lisina; Met – Metionina; Phe – Fenilalanina; Pro – Prolina; Ser – Serina; Thr – Treonina; Trp – Triptofano; Tyr – Tirosina; Val – Valina.

FONTE: A autora (2016).

## 6 CONCLUSÃO

- A sequência parcial do genoma de *F. multimorphosa* linhagem tipo CBS 980.96 foi obtida.
- A sequência está contida em 163 *contigs* e o genoma total tem 33.4Mbp.
- 11.772 genes codificadores de proteínas foram identificados no genoma de *F. multimorphosa* CBS 980.96<sup>T</sup>. Foram identificados também 32 genes de tRNA, 2 regiões parciais do gene 28S rRNA e uma região com sequência parcial dos genes 18S rRNA, *ITS1*, 5.8S rRNA e *ITS2*.
- O DNA genoma mitocondrial foi completamente montado resultando em um tamanho total de 26 kbp. O genoma mitocondrial codifica 19 genes codificadores de proteínas, 23 de tRNA e um 5S rRNA.
- Árvore filogenética utilizando os gene *CDC42* e *ITS* permitiram esclarecer melhor a posição taxonômica de *F. multimorphosa* CBS 980.96<sup>T</sup>.

## REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, Stephen F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal Of Molecular Biology**, [s.l.], v. 215, n. 3, p.403-410, out. 1990. Elsevier BV. DOI: 10.1016/s0022-2836(05)80360-2.

AM, Kathryn North. THE GLOBAL ALLIANCE FOR GENOMICS AND HEALTH. **Pathology**, [s.l.], v. 47, p.28-29, fev. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1097/01.pat.0000461407.88852.73>.

ASHBURNER, Michael et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology. **Nature Genetics**, [s.l.], v. 25, n. 1, p.25-29, maio 2000. Nature Publishing Group. DOI: 10.1038/75556.

AZEVEDO, Conceição M. P. S. de et al. Fonsecaea pugnacius, a Novel Agent of Disseminated Chromoblastomycosis. **J. Clin. Microbiol.**, [s.l.], v. 53, n. 8, p.2674-2685, 17 jun. 2015. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.00637-15>.

BAKER, Monya. De novo genome assembly: what every biologist should know. **Nature Methods**, [s.l.], v. 9, n. 4, p.333-337, 27 mar. 2012. Nature Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1935>.

BANKEVICH, Anton et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. **Journal Of Computational Biology**. 19(5): 455-477, 2012. doi: 10.1089/cmb.2012.0021.

BESEMER, J.. GeneMarkS: a self-training method for prediction of gene starts in microbial genomes. Implications for finding sequence motifs in regulatory regions. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 29, n. 12, p.2607-2618, 15 jun. 2001. Oxford University Press (OUP). DOI: 10.1093/nar/29.12.2607.

BOETZER, M. et al. Scaffolding pre-assembled contigs using SSPACE. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 27, n. 4, p.578-579, 12 dez. 2010. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btq683>.

CARNEIRO, A. R. **Montagem e análise comparativa do genoma de *Exiguobacterium antarcticum* linhagem B7**. 53 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular com ênfase em Bioinformática) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2011.

CARRER, Helaine; BARBOSA, André Luiz; RAMIRO, Daniel Alves. Biotecnologia na agricultura. **Estudos Avançados**, [s.l.], v. 24, n. 70, p.149-164, 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-40142010000300010>.

CARVALHO, M. C. C. G.; SILVA, D. C. G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas Next generation DNA sequencing and its applications in plant genomics. **Ciência Rural**, v. 40, n. 3, p. 735–744, 2010.

CHEN, Z. et al. Comparative Genomic and Transcriptomic Analysis of *Wangiella dermatitidis*, A Major Cause of Phaeohyphomycosis and a Model Black Yeast Human Pathogen. **G3: Genes|genomes|genetics**, [s.l.], v. 4, n. 4, p.561-578, 4 fev. 2014. Genetics Society of America. DOI: 10.1534/g3.113.009241.

CHEVREUX, B.; WEBER, J.; HORSTER, A.; DLUGOSCH, K. Sequence assembly with MIRA 4. Disponível em: <[http://mira-assembler.sourceforge.net/docs/DefinitiveGuideToMIRA.html#sect\\_intro\\_whatismira](http://mira-assembler.sourceforge.net/docs/DefinitiveGuideToMIRA.html#sect_intro_whatismira)>. Acesso em: 12/8/2014.

COSTA, J. M. **Caracterização enzimática de agentes da cromoblastomicose com ênfase em atividade lipase**. 147 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

DALMOLIN, Rodrigo Juliani Siqueira. **Desenvolvimento de ferramentas de bioinformática para o estudo evolutivo de sistemas bioquímicos**. 2012. 268 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas: Bioquímica, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

DEREEPER A.\*, GUIGNON V.\*, BLANC G., AUDIC S., BUFFET S., CHEVENET F., DUFAYARD J.F., GUINDON S., LEFORT V., LESCOT M., CLAVERIE J.M., GASCUEL O. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res.* 2008 Jul 1;36(Web Server issue):W465-9. Epub 2008 Apr 19. (PubMed)

DOYMAZ, Mehmet Z. et al. A case of cerebral phaeohyphomycosis caused by *Fonsecaea monophora*, a neurotropic dematiaceous fungus, and a review of the literature. **Mycoses**, [s.l.], v. 58, n. 3, p.187-192, 15 jan. 2015. Wiley-Blackwell. DOI: 10.1111/myc.12290.

EISENMAN, Helene C.; CASADEVALL, Arturo. Synthesis and assembly of fungal melanin. **Appl Microbiol Biotechnol**, [s.l.], v. 93, n. 3, p.931-940, 16 dez. 2011. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1007/s00253-011-3777-2.

FERRAZ, Miguel Campelo de Melo. **Caracterização do transcriptoma parcial do fungo patogênico *Fonsecaea pedrosoi***. 2011. 133 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia Molecular, Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

GIBNEY, P. A. et al. Yeast metabolic and signaling genes are required for heat-shock survival and have little overlap with the heat-induced genes. **Proceedings Of**

**The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 110, n. 46, p.4393-4402, 28 out. 2013. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1318100110>.

GOFFEAU, A. et al. Life with 6000 Genes. **Science**, [s.l.], v. 274, n. 5287, p.546-567, 25 out. 1996. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.274.5287.546>.

Guizelini D., Vialle R. RAFTS3: Rapid Alignment Free Tool for Sequences Similarity Search. Available at: <https://sourceforge.net/projects/rafts3/>

HOLT, Kathryn E. et al. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 112, n. 27, p.3574-3581, 22 jun. 2015. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1501049112>.

HOTOPP, J. C. D. et al. Widespread Lateral Gene Transfer from Intracellular Bacteria to Multicellular Eukaryotes. **Science**, [s.l.], v. 317, n. 5845, p.1753-1756, 21 set. 2007. American Association for the Advancement of Science (AAAS).

JAIN, Miten et al. Improved data analysis for the MinION nanopore sequencer. **Nature Methods**, [s.l.], v. 12, n. 4, p.351-356, 16 fev. 2015. Nature Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.3290>.

KENT, W. J.. BLAT---The BLAST-Like Alignment Tool. **Genome Research**, [s.l.], v. 12, n. 4, p.656-664, 20 mar. 2002. Cold Spring Harbor Laboratory Press. DOI: 10.1101/gr.229202.

KOSUGI, Shunichi; HIRAKAWA, Hideki; TABATA, Satoshi. GMcloser: closing gaps in assemblies accurately with a likelihood-based selection of contig or long-read alignments. **Bioinformatics**, [s.l.], p.465-475, 10 ago. 2015. Oxford University Press (OUP). DOI: 10.1093/bioinformatics/btv465.

LANGMEAD, Ben; SALZBERG, Steven L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods**, [s.l.], v. 9, n. 4, p.357-359, 4 mar. 2012. Nature Publishing Group. DOI: 10.1038/nmeth.1923.

LASLETT, D.. ARAGORN, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 32, n. 1, p.11-16, 2 jan. 2004. Oxford University Press (OUP). DOI: 10.1093/nar/gkh152.

LIU, L.; LI, Y.; LI, S.; et al. Comparison of next-generation sequencing systems. **J Biom Biotech**, v. 2012, p. 1 – 11, 2012.

LIU, Lin et al. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. **Journal Of Biomedicine And Biotechnology**, [s.l.], v. 2012, p.1-11, 2012. Hindawi Publishing Corporation. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/251364>.

LU, Chin Lung et al. CAR: contig assembly of prokaryotic draft genomes using rearrangements. **Bmc Bioinformatics**, [s.l.], v. 15, n. 1, p.1-15, 28 nov. 2014. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1186/s12859-014-0381-3>.

MathWorks®. **MATLAB - Matrix Laboratory**, versão R2012b. United States, 1994. Download.

MILNE, I. et al. Using Tablet for visual exploration of second-generation sequencing data. **Briefings In Bioinformatics**, [s.l.], v. 14, n. 2, p.193-202, 24 mar. 2012. Oxford University Press (OUP). DOI: 10.1093/bib/bbs012.

NADALIN, Francesca; VEZZI Francesco; POLICRITI, Alberto. GapFiller: a de novo assembly approach to fill the gap within paired reads. **Bmc Bioinformatics**, [s.l.], v. 13, n. 14, p.1-16, 2012. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1186/1471-2105-13-s14-s8.

NAJAFZADEH M.j. et al. *Fonsecaea multimorphosa* sp. nov, a new species of Chaetothyriales isolated from a feline cerebral abscess. **Fungal Biology**, [s.l.], v. 115, n. 10, p.1066-1076, out. 2011. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.funbio.2011.06.007.

National Center for Biotechnology Information (NCBI). *Fonsecaea multimorphosa* CBS 102226. **Genome**. Bethesda EUA, 2015a. Disponível em <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=txid979981\[orgn\]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=txid979981[orgn])>. Acesso em: 09 fev. 2016.

National Center for Biotechnology Information (NCBI). *Fonsecaea pedrosoi* CBS 271.37. **Genome**. Bethesda EUA, 2015b. Disponível em <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=txid40355\[orgn\]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=txid40355[orgn])>. Acesso em: 09 fev. 2016.

PAULINO, Daniel et al. Sealer: a scalable gap-closing application for finishing draft genomes. **Bmc Bioinformatics**, [s.l.], v. 16, n. 1, p.1-8, 25 jul. 2015. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1186/s12859-015-0663-4.

PIHET, Marc et al. Melanin is an essential component for the integrity of the cell wall of *Aspergillus fumigatus* conidia. **Bmc Microbiology**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.177-188, 2009. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-9-177>.

PIRO, Vitor C et al. FGAP: an automated gap closing tool. **Bmc Research Notes**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.371-375, 2014. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1186/1756-0500-7-371.



QUEVILLON, E. et al. InterProScan: protein domains identifier. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 33, n. p.116-120, 1 jul. 2005. Oxford University Press (OUP). DOI: 10.1093/nar/gki442.

RIBEIRO, A. C. B. **LASZLO @ GALAXY - Um protótipo de serviço de montagem de genomas a partir de dados de sequenciamento de próxima geração (NGS)**. 276 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Computacional e Sistemas) - Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2012.

RUTHERFORD, K. et al. Artemis: sequence visualization and annotation. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 16, n. 10, p.944-945, 1 out. 2000. Oxford University Press (OUP). DOI: 10.1093/bioinformatics/16.10.944.

SANDE, Wendy W. J. van de. Phylogenetic Analysis of the Complete Mitochondrial Genome of *Madurella mycetomatis* Confirms Its Taxonomic Position within the Order Sordariales. **Plos One**, [s.l.], v. 7, n. 6, p.38654-38664, 6 jun. 2012. Public Library of Science (PLoS). DOI: 10.1371/journal.pone.0038654.

SANTOS, André L.s. et al. Biology and pathogenesis of *Fonsecaea pedrosoi*, the major etiologic agent of chromoblastomycosis. **Fems Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 31, n. 5, p.570-591, set. 2007. Oxford University Press (OUP). DOI: 10.1111/j.1574-6976.2007.00077.x.

SHINWARI, M. W.; THOMAS, A. D.; ORR, J. S.. Feline cerebral phaeohyphomycosis associated with *Cladosporium bantianum*. **Australian Vet J**, [s.l.], v. 62, n. 11, p.383-384, nov. 1985. Wiley-Blackwell. DOI: 10.1111/j.1751-0813.1985.tb14216.x. Disponível em: <http://api.wiley.com/onlinelibrary/tdm/v1/articles/10.1111/j.1751-0813.1985.tb14216.x>

SILVEIRA, L. **Montagem e anotação parcial da sequência genômica da bactéria diazotrófica *Azospirillum brasilense* FP2**. 74 f. Dissertação (Mestrado em Bioinformática) - Setor de Educação e Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, 2012.

SPRINGER, M. Applied Biosystems: Celebrating 25 Years of Advancing Science. May, 2006.

SUN, Jiufeng et al. Molecular Characterization of Pathogenic Members of the Genus *Fonsecaea* Using Multilocus Analysis. **Plos One**, [s.l.], v. 7, n. 8, p.1-10, 2 ago. 2012. Public Library of Science (PLoS). DOI: 10.1371/journal.pone.0041512.

SURI, Pooja et al. Cerebral Phaeohyphomycosis Due to *Cladophialophora bantiana* – A Case Report and Review of Literature from India. **Jcdr**, [s.l.], p.1-5, 2014. JCdr Research and Publications. DOI: 10.7860/jcdr/2014/7444.4216.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology And Evolution**, [s.l.], v. 30, n. 12, p.2725-2729, 16 out. 2013.

Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mst197>.

VAN DIJK, Erwin L. et al. Ten years of next-generation sequencing technology. **Trends In Genetics**, [s.l.], v. 30, n. 9, p.418-426, set. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2014.07.001>.

VARGHES, Prithvi et al. Cerebral Phaeohyphomycosis caused by *Fonsecaea monophora*: First report from India. **International Journal Of Surgery And Medicine**, [s.l.], p.1-6, 2015. ScopeMed International Medical Journal Management and Indexing System. DOI: 10.5455/ijsm.neurosurgery01.

VARUZZA, L. Introdução à análise de dados de sequenciadores de nova geração Versão 2 . 0. 1. 2013.

VERGHESE, J. et al. Biology of the Heat Shock Response and Protein Chaperones: Budding Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a Model System. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, [s.l.], v. 76, n. 2, p.115-158, 1 jun. 2012. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/membr.05018-11>.

VERLI (ORG), H. **Bioinformática da Biologia à flexibilidade molecular**. Porto Alegre, 2014.

VICENTE, V. A. et al. Environmental siblings of black agents of human chromoblastomycosis. **Fungal Diversity**, [s.l.], v. 65, n. 1, p.47-63, 22 jun. 2013. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1007/s13225-013-0246-5.

WALENZ, B. P. **Celera Assembler Users Guide, 2008**. Disponível em: <<http://wgs-assembler.sourceforge.net/runCA51.pdf>>. Acesso em: 09 fev. 2016.

WILSON, E. Cerebral abscess caused by *Cladosporium bantianum*. Case report. **Pathology**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.91-96, 1982. Elsevier BV. DOI: 10.3109/00313028209069050.

XIE, Zhi et al. Molecular cloning, characterization and differential expression of *Cdc42* in *Fonsecaea monophora*. **Molecular Biology Reports**, [s.l.], v. 39, n. 2, p.839-844, 15 maio 2011. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-011-0806-2>.

ZHAO, Jingjun et al. Isolation and Identification of Black Yeasts by Enrichment on Atmospheres of Monoaromatic Hydrocarbons. **Microb Ecol**, [s.l.], v. 60, n. 1, p.149-156, 24 mar. 2010. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1007/s00248-010-9651-4.

ZIMIN, A. V. et al. The MaSuRCA genome assembler. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 29, n. 21, p.2669-2677, 29 ago. 2013. Oxford University Press (OUP). DOI: 10.1093/bioinformatics/btt476.